

3P305

遺伝子発現量の定量的解析を目指したプローブ作製の検討

○金賢徹、岡野和宣、安田賢二（東大院・総合文化）

[目的] マイクロアレイを用いた遺伝子の網羅的解析は、生命現象を多数の分子の複合的相互作用効果という観点から研究する上で、必要不可欠の手段となっている。細胞を刺激し、それに誘導された細胞のダイナミックな挙動を、関連分子群の遺伝子の増減として観察することで、新たな知見が次々と得られている。また最近では、遺伝子レベルの解析のみならず、多数のタンパク質を基板に固定しマイクロアレイを作製することにより、タンパク質レベルでの網羅的発現解析を行う試みも積極的に行われている。マイクロアレイを用いたこのような解析はたいへん有効であるが、基板上に吸着した標的分子の検出を行う際に蛍光を用いる方法が主流であり、そのため吸着した標的分子数の定量化が難しい。そこで本研究では、基板上に吸着した標的遺伝子の数を定量的に解析するために、金微粒子をプローブとして用いる計測方法を開発した。

[実験方法] はじめに、標的遺伝子に相補的な遺伝子断片に、様々な大きさの金微粒子を取り付けた。次に、標的遺伝子を従来のマイクロアレイ基板上に吸着させた後、さらに金微粒子が付着した遺伝子断片を標的遺伝子に吸着させた。最後に、金微粒子を電子顕微鏡を用いて直接観察した。このように金微粒子の数を直接数えることで、標的遺伝子の定量化を試みた。以上の結果の詳細を報告する。

Kim, H., Okano, K., Yasuda, K. : Development of Probe Production for Quantitative Measurement of Expressed Gene Numbers

3P307

哺乳類におけるサーカディアンリズム中枢・視交叉上核の神経細胞の1細胞活動電位計測系の開発

○杉尾嘉宏¹、寺菌英之²、鈴木郁郎¹、金子智行¹、中嶋幹郎²、佐々木均²、神保泰彦³、安田賢二¹（¹東大・総合文化・生命、²長崎大・医学部歯学部附属病院・薬剤部、³東大・工学系・精密機械工学）

[目的] 哺乳類においては、自律神経系の中核である視床下部の前部神経核である視交叉上核 (Suprachiasmatic Nucleus: SCN) が個体の生理的反応および行動のサーカディアンリズムを支配している。分散培養した神経細胞は、発火頻度に関して、個々に固有の周期と振動位相を持つサーカディアンリズムを示すことが知られている (David et al., *Neuron*, 14 (1995) 697-706)。また、その神経回路網の多点同時計測により取得した発火頻度の時間推移を見ると、細胞間で同調することが報告されている (Shirakawa et al., *Eur. J. Neurosci.*, 12 (2000) 2833-2838)。このことから SCN の神経細胞間で同調したリズムを実現するために、細胞間で振動位相に関する情報のやり取りが行われていると考えられているが、その詳細は不明である。

本研究は、シナプス結合の形成に伴う個々の神経細胞の活動周期の変化と、その細胞間での同調のダイナミクスを理解することを目的とし、これを計測する実験系を構築することを目標とした。

[方法と結果] 0-3日齢の Wistar 系ラットの新生仔の脳から、チョッパーを用いて視床下部前部の脳切片を作製し、SCN 領域を回収、その組織片を酵素処理して細胞懸濁液を調製した。培養神経細胞から活動電位を取得する多電極基板には、アガロース多電極アレイを用いた (Suzuki et al., *Jpn. J. Appl. Phys.*, 43 (2004) No.3B 403-406)。細胞はアガロースに対する接着能を持たないため、アガロースに構築した微細構造に神経細胞を孤立させ、突起の伸長を自在に誘導することが可能である。細胞はマイクロピペットを用いてひとつずつ微細構造内に配置した。そして1細胞孤立状態で神経細胞の活動電位の計測に成功した。結果の詳細は本会にて報告する。

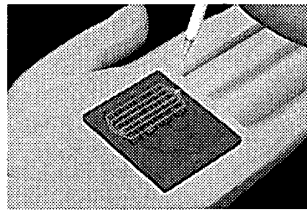
Y. Sugio, H. Terazono, I. Suzuki, T. Kaneko, M. Nakashima, H. Sasaki, Y. Jimbo, K. Yasuda : Development of a new system for acquiring action potentials from individual neurons derived from suprachiasmatic nucleus.

3P306

ポリマー複製方式によるシングルモード導波路型表面プラズモン共鳴センサーの開発

○西川武男¹、岸本潤¹、瀬崎浩史²、松下智彦¹、山下英之¹、兼岡茂巳²、和沢鉄一²、青山茂¹（¹オムロン株式会社・技術本部、²阪大院・生命機能）

近年、高感度な蛋白質間相互作用の解析手法として表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーが広く用いられているが、その解析装置は大きく、センサーチップも含めて高価であるといった課題がある。本研究ではこれらの課題を踏まえ、解析装置とセンサーチップの小型化、低価格化を実現するための研究を行う。シングルモード導波路は、コアと呼ばれる断面サイズが数 μm \times 数 μm の高屈折率部に光を閉じ込めて伝搬させる光学素子であり、その高い機能性、集積性から光通信分野で注目を集めている。我々は、このシングルモード導波路と表面プラズモン共鳴を組み合わせることで小型、集積化可能なセンサーの開発を行った。また一般的に、導波路は半導体プロセスで作製されるが、コスト面での優位性から、本研究ではポリマー樹脂を用いた金型、複製方式により、高スループット、ローコストなチップ作製を実施した。今回試作したセンサーについて、表面の誘電体多層膜構造を変えることによりセンサーの特性調整が可能であることを示し、これらの結果は光学シミュレーション結果と良好な一致が確認された。さらに実際に蛋白質の相互作用解析についても評価を行っていく予定である。



T.Nishikawa, J.Kishimoto, H.Sezaki, T.Matsushita, H.Yamashita, S.Norioka, T.Wazawa and S.Aoyama : Development of a single-mode waveguide SPR sensor fabricated through a polymer replication method

3P308

大腸菌の成長静止期培養液に対する応答の1細胞解析

○若本祐一、安田賢二（東大院・総合文化）

[目的] 細胞は過去に経験した環境条件の違いによって全く同じ環境であっても異なる状態を取ることは良く知られている。細胞の過去の情報に依存した状態決定の規則性を実験的に調べるためには、特定の細胞に観察者が設定した環境変化条件を与え、その中で細胞の状態変化過程を観察し続ける必要がある。我々は、特定の細胞を孤立条件下で観察し続けることで、同一遺伝情報をもつ大腸菌の1細胞由来の子孫間で環境変化への応答の違いが存在するか、更に、応答に差がある場合、その差は環境変化前の状態に依存するかを明らかにすることを旨とした。

[実験方法および結果] まず、オンチップ1細胞培養システムを用い、大腸菌細胞を孤立化条件下で培養し、対数増殖期状態の再現を確認した。この細胞に、静止期の培養液を様々な濃度に希釈したものを環境変化条件として加え、この新しい環境下での大腸菌の成長速度・細胞周期などの変化を1細胞レベルで観察した。その結果、対数増殖期では、分裂周期の平均が52分で盛んに成長・分裂を行う細胞であっても、100% (希釈なし) の静止期培養液を与えた場合、全ての細胞が10分以内に成長を停止することが分かった。更に、この成長停止は、100%静止期培養液に栄養物質を添加しても変化しないことから、静止期培養液中の栄養の有無には依存せず起こることも確認できた。静止期培養液を新鮮な培地と混合し、対数増殖期の細胞に課した場合、静止期培養液濃度が50%程度から成長速度の抑制が始まり、濃度を上げるにつれて急激に抑制の度合いが大きくなる濃度に対しての非線形な応答があることが分かった。また、50%~80%の濃度域では成長速度の応答に細胞間でばらつきが見られた。応答の違いと、環境変化前の個々の細胞の状態との関係など本研究の詳細については本会にて報告する予定である。

Y. Wakamoto and K. Yasuda : Analysis of response to stationary phase buffer in *Escherichia coli*